

1. FINALIDADE:

Meio de cultura nutritivo, destinado principalmente à execução do antibiograma pela técnica de difusão método Bauer-Kirby.

2. PRINCÍPIO DO MÉTODO:

No início dos anos 1960, os laboratórios de microbiologia clínica utilizavam diversos procedimentos para a determinação da susceptibilidade bacteriana aos antibióticos e agentes quimioterápicos. Bauer, Kirby e outros desenvolveram então um procedimento padronizado em que o ágar Mueller Hinton foi selecionado como o meio de teste. Um estudo colaborativo internacional subsequente confirmou o valor do ágar Mueller Hinton para esse propósito devido a relativamente boa reprodutibilidade do meio, a simplicidade de sua formulação e qualidade dos dados experimentais acumulados utilizando esse meio de cultura. O método de disco-difusão é uma das abordagens mais antigas para realização de testes de sensibilidade aos antimicrobianos e permanece como um dos mais amplamente utilizados na rotina dos laboratórios clínicos. É adequado para testar a maioria dos patógenos bacterianos, incluindo as bactérias fastidiosas mais comuns, é versátil em relação a gama de agentes antimicrobianos que podem ser testados e não requer equipamento especial. Da mesma forma que várias outras técnicas de disco-difusão, o método sugerido pelo EUCAST é padronizado e baseado nos princípios definidos no relatório do "International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing" de 1972, e a experiência dos grupos de especialistas em todo o mundo. Os pontos de corte dos halos de inibição no método BrCAST-EUCAST são calibrados para os pontos de corte europeus harmonizados, que estão publicados pelo BrCAST-EUCAST e são gratuitamente disponíveis no site do BrCAST (www.brcast.org.br).

3. APRESENTAÇÃO: *(Pacote com 10 placas)

APRESENTAÇÃO	CÓDIGO	QTD*
MUELLER HINTON - 90X15MM	1177	PCT
MUELLER HINTON - 90X15MM – EXPORTAÇÃO	5815	PCT
MUELLER HINTON - 140X15MM	1178	PCT
MUELLER HINTON + SANGUE DE CAVALO + BETA-NAD 90X15MM	4758	PCT
MUELLER HINTON + SANGUE DE CAVALO + BETA-NAD 140X15MM	3878	PCT
MUELLER HINTON + SANGUE 90X15MM	1233	PCT
MUELLER HINTON + SANGUE 140X15MM	1289	PCT

4. COMPOSIÇÃO:

O ágar Mueller Hinton possui uma substancial fonte de proteínas, carboidratos outras substâncias nitrogenadas além de minerais, vitaminas e outros nutrientes para suportar o crescimento de microrganismos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse clínico. Além disso, a baixa concentração de timina e timidina e níveis adequados dos íons de cálcio e magnésio (cátions ajustados), que quando controlados, evitam falsos resultados de sensibilidade ou resistência. O amido age como um colóide protetor contra substâncias tóxicas que podem estar presentes no meio. A hidrólise do amido durante a autoclavação fornece uma pequena quantidade de dextrose, que é uma fonte de energia.

EXTRATO DE CARNE -----	2 gr/L
DIGESTÃO ACIDA DE CASEÍNA -----	17,5 gr/L
AMIDO -----	1,5 gr/L
ÁGAR -----	17 gr/L
SANGUE DE CAVALO DESFIBRINADO* -----	50mL/L
β-NAD* -----	20mg/L

*os componentes estão presentes apenas na apresentação Agar Mueller Hinton + Sangue de Cavalos + 20mg/L β-NAD (MH-F).

5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE:

Este produto deve ser armazenado em temperatura de 2 a 8°C, imediatamente após seu recebimento. Para fins de transporte, poderá permanecer em temperatura entre 2 a 25°C.

6. AMOSTRAS:

Culturas recentes de bactérias 18-24h (overnight). Caso não seja possível a execução da prova após 18- 24h de incubação, proceder à repicagem das colônias e realizar a prova após este prazo de nova incubação. Descartar culturas que se apresentem contaminadas ou nas quais existam diversas espécies cultivadas que não possam ser separadas visualmente.

7. MATERIAIS NECESSÁRIOS (não fornecidos)

- Estufa bacteriológica;
- Alças bacteriológicas;
- Bico de Bunsen;
- Solução salina fisiológica estéril;
- Swab;
- Tubo contendo padrão 0,5 da escala Mac Farland;
- Turbidímetro;
- Incubadores (para incubar com tensão de CO₂);
- Pinça;
- Seleção de antibióticos;

- Paquímetro.

8. PROCEDIMENTO TÉCNICO:

• Antes de iniciar o teste de suscetibilidade, faça um teste de Gram para confirmar a pureza da colônia e determinar a bateria de teste apropriada.

8.1 Preparação do inóculo

- Usar o método de suspensão direta das colônias em salina para fazer a suspensão de microrganismos de modo a obter densidade equivalente ao padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland, que corresponde aproximadamente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para *Escherichia coli*.

- Ajustar a suspensão do inóculo de modo a obter turbidez correta adicionando salina ou mais bactérias. Um inóculo mais denso pode resultar em halos menores e inóculo com menor densidade terá um efeito oposto.

- O método da suspensão direta das colônias é apropriado para todos os microrganismos, incluindo os microrganismos fastidiosos.

- Preparar a suspensão a partir de um crescimento overnight em um meio não seletivo. Usar várias colônias morfológicamente similares (quando possível) para evitar selecionar variantes atípicas e suspenda as colônias em salina com alça estéril ou swab de algodão.

- As suspensões de *Streptococcus pneumoniae* devem ser preferencialmente preparadas a partir de cultura obtida em de ágar sangue de modo a obter densidade equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Quando a suspensão for preparada a partir de cultura em ágar chocolate, a turbidez do inóculo deve ser equivalente ao padrão 1.0 da escala de McFarland.

8.2 Inoculação das placas de ágar

- Garantir que as placas estejam em temperatura ambiente previamente à inoculação.

- Preferencialmente utilizar a suspensão ajustada do inóculo em até 15 minutos após a preparação. A suspensão deve ser obrigatoriamente utilizada em até 60 minutos após a preparação.

- Mergulhar um swab de algodão estéril na suspensão, para evitar a inoculação excessiva das placas de microrganismos gram-negativos, remova o excesso de líquido pressionando e girando o swab contra a parte interna do tubo acima do nível da suspensão, para bactérias gram-positivas, não pressione o swab contra a parte interna do tubo.

- As placas podem ser inoculadas tanto espalhando o inóculo uniformemente em três direções como por um inoculador automatizado.

- Espalhar o inóculo uniformemente sobre toda a superfície assegurando que não haja falhas. Para bactérias gram-

positivas, tenha atenção especial a fim de garantir que não exista diferença na semeadura.

- Aplicar os discos em até 15 min após a inoculação da placa. Se as placas inoculadas forem deixadas em temperatura ambiente por períodos prolongados de tempo antes da aplicação dos discos, os microrganismos podem começar a crescer, resultando em redução errônea do tamanho dos halos de inibição.

8.3 Aplicação dos discos de antimicrobianos

- O conteúdo (potência) dos discos a serem utilizados está descrito nas tabelas de pontos de corte e controle de qualidade está disponível no site do BrCAST (<http://brcast.org.br>).

- Permitir que os discos alcancem a temperatura ambiente antes da abertura dos cartuchos ou recipientes utilizados para o armazenamento dos discos. Isto previne a condensação, que leva a rápida deterioração de alguns agentes. Aplicar os discos firmemente na superfície da placa de ágar dentro de 15 minutos da inoculação. O contato dos discos com a superfície do ágar deve ser completo. Os discos não podem ser removidos após a aplicação nas placas, uma vez que a difusão dos agentes antimicrobianos dos discos é muito rápida.

- O número de discos nas placas deve ser limitado para impedir sobreposição dos halos e a interferência entre os antimicrobianos. É importante que os diâmetros dos halos sejam medidos corretamente. O número máximo de discos varia de acordo com o microrganismo e a seleção dos discos. Normalmente, 6 e 12 discos são os números máximos possíveis, respectivamente, em placas circulares de 90 e 140 mm.

8.4. Incubação das placas

Inverter as placas e assegurar que os discos não caiam na superfície do ágar. Incubar em até 15 minutos após a aplicação dos discos. Se as placas forem deixadas em temperatura ambiente após a aplicação dos discos, a pré-difusão pode resultar em halos de inibição erroneamente aumentados.

O empilhamento das placas na estufa pode alterar os resultados devido ao aquecimento desigual entre elas. A eficiência das estufas varia e dessa forma o controle de incubação, incluindo o número apropriado de placas empilhadas deve fazer parte do programa de garantia de qualidade do laboratório.

Incubar as placas de acordo com as condições apresentadas manual de disco difusão disponível no site do BrCAST (<http://brcast.org.br>) respeitando as particularidades de incubação para cada microrganismo. Incubação além do limite de tempo recomendado não é permitido uma vez que

resulta no crescimento dentro do halo de inibição e reporte de isolados falso-resistentes.

8.5 Observação das placas após incubação

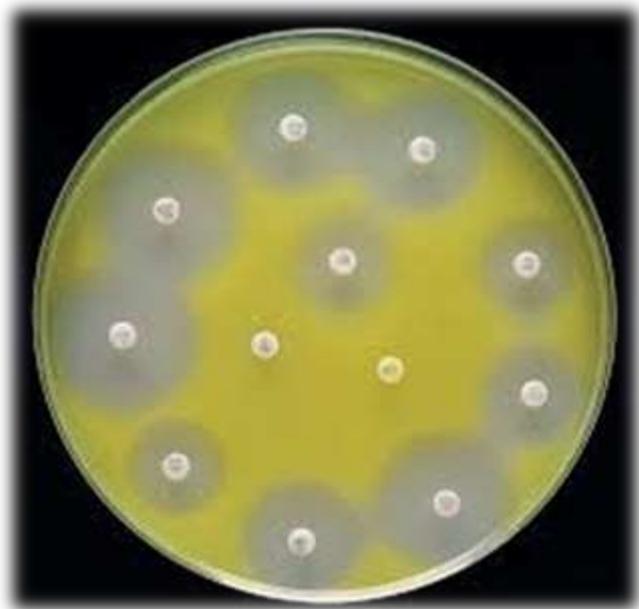
- Um inóculo correto e placas satisfatoriamente semeadas devem resultar em crescimento confluyente. Quando forem observadas colônias isoladas, o inóculo é muito escasso e o teste deve ser repetido.
- O crescimento deve ser uniformemente distribuído na superfície do ágar para obter halos de inibição uniformemente circulares (não distorcidos).
- Realizar frequentemente o controle de qualidade dos insumos em uso para garantir que os discos antimicrobianos não perderam a potência durante o armazenamento.

8.6. Aferição e interpretação dos diâmetros dos halos de inibição

- Interpretar os diâmetros dos halos de acordo com valores de corte contidos nas tabelas disponíveis no site do BrCAST (<http://brcast.org.br>) respeitando as particularidades de leitura para cada microrganismo.
- Medir o diâmetro dos halos na zona de inibição com régua apropriada ou paquímetro.

9. RESULTADOS

Os halos de inibição em torno dos discos devem ser comparados com os estabelecidos com valores de corte contidos nas tabelas disponíveis no site do BrCAST (<http://brcast.org.br>). Os resultados obtidos com microrganismos específicos devem ser reportados como resistente, intermediário ou suscetível.



Pseudomonas aeruginosa/ Ágar Mueller Hinton



Streptococcus pneumoniae/ Ágar Mueller Hinton sangue

10. LIMITAÇÕES DO MÉTODO

- Inúmeros fatores podem influenciar os testes de suscetibilidade por difusão em disco, incluindo a composição do meio, excesso de umidade na superfície do meio, profundidade do ágar, potência do disco, concentração do inóculo, pH, atmosfera de incubação, etc. sendo assim, é requerido o estrito acompanhamento do protocolo para assegurar resultados confiáveis.
- Quando o ágar Mueller Hinton é suplementado com sangue, a zona de inibição para oxacilina e metilicina pode ser 2-3 mm menor do que a obtida com o meio não suplementado. O sangue de carneiro pode aumentar os diâmetros dos halos de algumas Cefalosporinas quando testadas com *Enterococcus*. O sangue de carneiro pode causar halos indistintos ou um filme de crescimento dentro das zonas de inibição em torno dos discos de sulfonamida e trimetoprim.
- Na presença de aparecimento de quaisquer estruturas, que remetam a possível contaminação, o produto deve ser imediatamente descartado.
- Meios de cultura apresentam grande quantidade de água em sua formulação, deste modo, variações de temperatura devem ocasionar a condensação e, conseqüentemente, o acúmulo de água.
- O cuidado com o acondicionamento e exposição do meio a estas variações de temperatura são fundamentais para a manutenção da qualidade do produto.

- Algumas variações de coloração na colônia, morfologia ou tamanho podem ocorrer, devido a características únicas da cepa analisada.
- Inóculos com excesso de carga bacteriana podem interferir na avaliação de resultados.
- Resultados falso negativos podem ocorrer por técnica de coleta inadequada, armazenamento e transporte inadequados da amostra, tempo de incubação insuficiente, utilização da alça não resfriada após a flambagem.
- Resultados falso positivos podem ocorrer por erro na conservação do material, técnica de assepsia inadequada, tempo de incubação excessivo, contaminação cruzada, utilização de produto vencido, contaminado ou em condições inadequadas.

11. CONTROLE DE QUALIDADE

Utilizar as cepas controle especificadas para monitorar o desempenho do teste. As principais cepas controle recomendadas são cepas tipicamente sensíveis, mas cepas resistentes (isolados-desafio) também podem ser utilizadas para confirmar que um método é capaz de detectar resistência mediada por mecanismos de resistência conhecidos. Os intervalos aceitáveis para as cepas controle são listados no site do BrCAST (<http://brcast.org.br>). Caso se constate algum problema, os resultados de amostras clínicas não devem ser liberados até que as causas tenham sido apuradas devidamente e os problemas constatados sanados.

12. PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

- Somente para uso diagnóstico “in vitro”.
- Não usar após data de validade, produto avariados e/ou com embalagens violadas.
- Antes de descartar o material usado, autoclavar a 121° C por 15 minutos.
- Descartar o produto e as amostras de acordo com as resoluções normativas locais, estaduais e federais de preservação do meio ambiente.
- Observar a correlação da versão das instruções de uso e o produto adquirido, conforme disponibilizado no site: www.renylab.ind.br.

13. GARANTIA DA QUALIDADE:

A RenyLab obedece ao disposto na Lei 8.078/90, Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário:

- Que o usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento.
- Que os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas.

- Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente conforme calendário estabelecido pela empresa até a data de vencimento.

- Os certificados de análise de cada lote poderão ser obtidos no site www.renylab.ind.br.

- Em caso de dúvidas, problemas de origem técnica, ou necessidade de obtenção dos mesmos em formato impresso entrar em contato com o SAC (Serviço de Atendimento ao Consumidor) através do telefone (32) 3331-4489 ou pelo e-mail sac@renylab.ind.br.

- Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha da RenyLab, assim como o envio de documentos em formato não impresso, serão enviados sem custos adicionais ao cliente.

14. DEPARTAMENTO DE SERVIÇOS ASSOCIADOS:

Para esclarecimentos de dúvidas do consumidor quanto ao produto: Telefax: (32) 3331-4489 sac@renylab.ind.br

Nº DO LOTE, DATA DE VALIDADE – VIDE RÓTULO

15. TERMO DE GARANTIA

A RenyLab garante a troca deste produto, desde que o mesmo esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado por sua Assessoria Técnica que não houve falhas na execução, manuseio e conservação deste produto. A RenyLab e seus distribuidores não se responsabilizam por falhas no desempenho de produtos sob essas condições.

16. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANVISA, Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos; Bauer, Kirby, Sherris and Turck. 1966. Am. J. Clin. Pathol. 45:493.
2. BrCAST - Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos Versão 6.0.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Approved standard: M2-A9.
4. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 9th ed.
5. CLSI, Wayne, Pa.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, M100-S18(M2).
7. CLSI, Wayne, Pa. Comitê Europeu de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos Controle de Qualidade de Rotina e Controle de Qualidade Interno para Determinação da

CIM e Disco-Difusão Conforme Recomendação do Br-CAST-EUCAST.

8. MERCK. Manual de meios de cultivo. Darmstadt, 1990. Método de disco-difusão para teste de sensibilidade aos antimicrobianos do EUCAST Versão 4.0.

9. Mueller and Hinton. 1941. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48:330 Oplustil, C.P., Zoccoli, C.M., Tobouti, N.R., e Sinto, S.I. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica, Sarvier, São Paulo, 2000.

10. Quality Control for commercially prepared microbiological Means of Culture; Approved Standard CLSI M22-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.

17. FABRICADO E DISTRIBUÍDO POR:

RenyLab Química e Farmacêutica Ltda.

Rodovia BR 040 km 697 Caiçaras.

CEP: 36.205-666 - Barbacena - MG – Brasil. Tel.: 55 32 3331-4489 CNPJ: 00.562.583/0001-44.

Site: www.renylab.ind.br

Responsável técnico: Renata C. Vaz de Mello.

CRF-MG: 12126

18. SIMBOLOGIA

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NO RÓTULO DO PRODUTO	
	Data limite de utilização do produto (dd/mm/aaaa)
	Limite de temperatura (conservar a)